氮添加对天山高寒草原土壤酶活性和酶化学计量特征的影响[①]

勒佳佳[1,2]， 苏 原[1,2]， 彭庆文[1,2]， 耿凤展[1,2]， 韩文轩[1,3]， 李文利[4]，
李凯辉[1,5]， 刘学军[1,3]

（1. 中国科学院新疆生态与地理研究所干旱区生物地理与生物资源重点实验室，乌鲁木齐 830011；
2. 中国科学院大学，北京 100049；3. 中国农业大学资源与环境学院，北京 100193；
4. 新疆巴音郭楞蒙古自治州草原工作站，库尔勒 841000；
5. 中国科学院巴音布鲁克草原生态系统研究站，巴音布鲁克 841314）

摘 要：为探究氮添加对高寒草原生态系统土壤酶活性的影响，于 2018 年在中国科学院巴音布鲁克草原生态系统研究站，选择 4 个氮添加水平（对照，N0，0 kg · hm^{-2} · a^{-1}；低氮，N1，10 kg · hm^{-2} · a^{-1}；中氮，N3，30 kg · hm^{-2} · a^{-1}；高氮，N9，90 kg · hm^{-2} · a^{-1}），开展土壤酶活性对氮添加响应的研究，分析土壤酶活性对氮添加的响应特点，土壤酶化学计量比以及土壤酶活性与土壤环境因子的关系。结果表明：与对照相比，氮添加在 N3 水平显著增加 β－1，4 葡萄糖苷酶（βG）、β－D－纤维二糖水解酶（CBH）和 β－1，4 木糖苷酶（βX）酶活性（$P<0.05$），N1 和 N3 水平显著增加碱性磷酸酶（AKP）活性（$P<0.05$），N3 水平显著降低多酚氧化酶（PPO）活性（$P<0.05$），氮添加对亮氨酸氨基肽酶（LAP）活性影响不显著，N3 水平下显著增加 N－乙酰－β－D 氨基葡萄糖苷酶（NAG）活性（$P<0.05$）。相关分析表明，8 种土壤酶活性均与土壤有机碳（SOC、NAG 除外）和总磷（TP）显著相关，与土壤总氮（TN）不相关。研究区土壤酶活性 C:N:P 化学计量比为 1:1:1.2，与全球生态系统的土壤酶活性 C:N:P 的比值 1:1:1 相偏离，表明该研究区土壤微生物生长受磷素限制。冗余分析（RDA）进一步揭示出土壤有机碳和土壤全磷含量是影响土壤酶活性的主要因子。

关键词：氮添加；土壤酶活性；土壤酶化学计量；养分限制；高寒草原；巴音布鲁克

大气氮沉降会影响物种多样性、微生物的活性和土壤养分含量等[1]。氮沉降增加不仅会影响草原植物生长，还会通过影响微生物对有机质的降解速率和微生物活性，而对土壤养分循环产生影响。土壤酶是土壤有机质分解和养分矿化的重要参与者，对氮添加敏感。国内关于该领域有一些研究报道，但是研究结果存在差异。王杰等[2]对内蒙古温带草甸草原土壤酶活性研究发现，土壤脲酶和过氧化氢酶的活性随施氮量的增加而升高，多酚氧化酶随施氮量的增加呈下降的趋势，土壤有机碳浓度和总氮浓度呈增加趋势。Li 等[3]研究发现氮沉降增加农田系统 β－1，4 葡萄糖苷酶和 N－乙酰－β－D 氨基葡萄糖苷酶活性，对多酚氧化酶活性影响不显著。Zhou 等[4]对新疆荒漠土壤酶活性研究得出，氮添加会通过影响脲酶、转化酶、多酚氧化酶、过氧化物酶和碱性磷酸酶活性影响土壤碳转化，增加土壤中氮和磷的利用率。苏洁琼等[5]研究得出，氮添加对抑制土壤脲酶、过氧化物酶和脱氢酶酶活性，且酶活性与土壤有机碳浓度和土壤全氮浓度存在负相关，与土壤总磷不相关。总之，氮沉降对土壤酶活性的影响因植被类型、土壤养分有效性、氮添加量和氮添加时间长短不同而存在明显差异。目前，相关研究在荒漠化草原[5]、典型草原[6]、温带草原[7]研究较多，而对长期氮添加对高寒草甸土壤酶活性的研究较少。

土壤酶主要来源于土壤微生物和植物分泌物，是土壤生物化学过程的主要催化剂。土壤养分循环的核心要素是碳（C）、氮（N）、磷（P），土壤 C、N、P

① **收稿日期：**2019－04－28； **修订日期：**2019－06－12
基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学基金项目（2016D01A076）和国家自然科学基金面上项目（41673079）资助
作者简介：勒佳佳（1993－），女，硕士研究生，研究方向为草原生态学. E-mail：lejiajia1006983797@163.com
通讯作者：李凯辉. E-mail：likh@ms.xjb.ac.cn；刘学军. E-mail：liu310@cau.edu.cn

转化酶对土壤中的 C、N、P 元素转化和迁移具有重要作用[8]。土壤碳循环酶主要有 β－1,4 葡萄糖苷酶(βG)、β－D－纤维二糖水解酶(CBH)、β－1,4 木糖苷酶(βX),氮循环酶有亮氨酸氨基肽酶(LAP)、N－乙酰－β－D 氨基葡萄糖苷(NAG),磷循环酶有碱性磷酸酶(AKP)。常用 β－1,4 葡萄糖苷酶(βG)、亮氨酸氨基肽酶(LAP)、N－乙酰－β－D 氨基葡萄糖苷酶(NAG)和磷酸酶(AKP)活性表征土壤微生物代谢速率及生物地球化学循环[9],多酚氧化酶(PPO)活性与土壤腐殖化过程、生物呼吸强度紧密相关。Sinsabaugh 等[10]提出了土壤酶化学计量的概念,目前的研究常将微生物酶的 ln(βG):ln(LAP + ANG)、ln(βG):ln(AKP)和 ln(LAP + NAG):ln(AKP)与土壤的 C:N、C:P 和 N:P 相联系,用于评价微生物养分利用和养分需求,并在一定程度上指示土壤养分有效性[11]。Sinsabaugh 等[10]通过研究 40 个生态系统指出,土壤 C、N、P 酶化学计量比遵循 1:1:1 的关系。土壤生态酶化学计量比可用来预测土壤养分循环限制元素,Hill 等[11]基于沉积物中土壤酶活性化学计量比得出研究区域受 P 元素限制。此外,土壤酶化学计量比与土壤养分化学计量比可能存在动态平衡关系[12]。

土壤酶活性对氮添加的响应特点以及土壤 C、N、P 酶活性的变化是否会影响土壤 C、N、P 养分元素循环?氮添加下土壤微生物生长的限制元素是什么?这些问题在新疆高寒草原都没有得到答案。所以,本研究依托中国科学院巴音布鲁克草原生态系统研究站,研究土壤酶活性对长期氮添加的响应,计算土壤酶化学计量比,探究土壤酶活性变化的驱动因素以及该区域养分循环的限制元素和土壤酶活性的变动对土壤养分的作用,为天山高寒草原养分评估提供基础数据和科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与实验设计

研究区选于新疆天山巴音布鲁克高寒草原试验站(42°52′45.52″～42°53′10.18″N,83°41′45.21″～83°43′07.38″E)。年降水量 265.7 mm,年蒸发量 1 022.9～1 247.5 mm,年日照 2 466～2 616 h,全年积雪日达 150～180 d,属于典型的高寒气候。所选草原为紫花针茅草原,该区植被物种比较单一,7～11 个·m^{-2}物种,优势物种为羊茅(*Festuca ovina*)、紫花针茅(*Stipa purpurea*)等。土壤为栗钙土,pH 为 7.87,土壤有机质浓度为 59.9 g·kg^{-1}。

于 2009 年设置施氮实验,氮的输入水平主要考虑了研究区无机氮沉降量(6.82 kg·hm^{-2}·a^{-1})、华北平原氮沉降量[13]以及中国大城市氮沉降量[14]。设置对照(N0,0 kg·hm^{-2}·a^{-1})、低氮(N1,10 kg·hm^{-2}·a^{-1})、中氮(N3,30 kg·hm^{-2}·a^{-1})、高氮(N9,90 kg·hm^{-2}·a^{-1})4 个处理,每个处理设置 3 个重复,随机区组排列,每个处理的小区面积为 32 m^2(8 m × 4 m),小区间隔 1 m,2009—2018 年,每年 5 月和 6 月下旬,将 NH_4NO_3 溶入 16 L 水中,分 2 次施入(每次施氮 50%)。

1.2 样品的采集、处理和测定

1.2.1 土壤采集　于 2018 年 8 月采集土壤样品。在每个样方中用土钻按“S”形随机选取 5 个点,采集 0～10 cm 土层土壤样品。土样过 0.25 mm 的筛,去除土壤中可见的根及石砾等,装入带有标识的自封袋,放入便携式冰盒中立即带回实验室。将土壤样品分为 2 份,1 份土样储存在 4 ℃冰箱中,用于土壤酶活性测定;1 份土样自然风干后,用于测定其他基本理化性质。

1.2.2 土壤理化性质的测定　土壤有机碳(SOC)采用重铬酸钾滴定法测定,全氮(TN)采用半微量凯式定氮法测定,全磷(TP)采用高氯酸－硫酸－钼锑抗比色法测定,速效磷(AP)采用碳酸氢钠－钼锑抗显色法测定,速效氮(AN)采用 FOSS 全自动定氮仪测定[15]。

1.2.3 土壤酶活性测定　β－1,4 葡萄糖苷酶(β－1,4－glucosidse,βG)、β－D－纤维二糖水解酶(Cellobiohydrolase,CBH)、β－1,4 木糖苷酶(β－1,4－xylosidase,βX)、亮氨酸氨基肽酶(L－leucine aminopeptidase,LAP)、N－乙酰－β－D 氨基葡萄糖苷(β－1,4－N－acetylgucosaminidase,NAG)和碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase,AKP)采用微孔板荧光法[16],多酚氧化酶(Phenol oxidase,PPO)采用邻苯三酚比色法[17],测定过程中均设定 3 次重复。

1.3 数据处理

不同氮添加水平对土壤酶活性影响的差异显著检验利用单因素方差分析(One-way ANOVA),LSD 和 Dunnett T3 多重比较法(α＝0.05)。基于相关矩阵对 8 种土壤酶活性进行主成分分析(PCA)。所有数据在进行 One-way ANOVA、PCA 和回归分析前都进行正态性检验。利用冗余分析(RDA)检验土壤

酶活性与土壤环境因子间的关系。One-way ANOVA 和回归分析采用 SPSS 23.0 软件，PCA 和 RDA 在 CANOCO 4.5 软件完成，利用 Origin 9.0 制图。

利用土壤酶化学计量的向量分析（length，L；angle，A）预测土壤养分循环限制因素[18]。

$$\text{Vector L} = \sqrt{\left[\frac{\ln\beta G}{\ln(LAP+NAG)}\right]^2 + \left(\frac{\ln\beta G}{\ln AKP}\right)^2} \quad (1)$$

$$\text{Vector A} = \text{Degrees}\left[\text{ATANT2}\left(\frac{\ln\beta G}{\ln AKP}\right), \frac{\ln\beta G}{\ln(LAP+NAG)}\right] \quad (2)$$

相对较长的 Vector L 表示有较大的碳限制；角度（Vector A）< 45°和 > 45°分别表示 N 限制和 P 限制。

2 结果与分析

2.1 氮添加对土壤碳氮磷含量及化学计量比的影响

在连续 10 a 氮添加背景下，新疆天山高寒草原 SOC 浓度范围是 36.05 ~ 42.39 $g \cdot kg^{-1}$，TN 为 3.21 ~ 4.52 $g \cdot kg^{-1}$，TP 为 0.48 ~ 0.86 $g \cdot kg^{-1}$。与对照相比，氮添加增加 SOC 浓度，低氮处理和中氮处理分别显著增加 SOC 浓度的 8.8% 和 12.2%；低氮和高氮处理对 TP 影响不显著，中氮处理 TP 显著增加 36.8%（表 1）。不同氮添加处理对土壤全氮、速效养分（速效氮、速效磷）和土壤 pH 无显著影响。与对照相比，中氮处理显著增加 SOC:TN，显著降低 SOC:TP 和 TN:TP。土壤养分浓度（尤其是 SOC）对氮添加的响应存在一定差异，进而引起土壤养分计量比响应出现分歧。

2.2 氮添加对土壤酶活性的影响

碳、氮、磷循环相关酶及氧化还原酶酶活性对不同氮沉降水平的响应存在差异。施氮增加碳循环相关酶（βG、CBH、βX）活性（图 1a，1b，1c），分别是对照样地的 0.47 倍、1.44 倍和 1.24 倍，仅在 N3 处理达到显著性水平（$P < 0.05$）。氮循环相关酶（LAP、NAG）活性对氮添加的响应特点存在差异，N3 处理显著增加 NAG 活性（$P < 0.05$），分别是 N0、N1 和 N9 处理的 0.49 倍、0.71 倍和 0.81 倍，氮添加对土壤 LAP 活性无显著影响（图 1d，1e）。氮添加增加土壤碱性磷循环酶（AKP）活性，在 N1 和 N3 处理达到显著水平，在 N3 处理碱性磷循环酶活性达到最大值（图 1f）。氮添加抑制氧化还原酶（PPO）活性，降低 4% ~ 15.5%，而且在 N3 处理下的酶活性显著 N0、N1 和 N9 沉降处理（图 1g）。由图 2 显示，N3 处理水平与沿 PCA1 N0、N1 和 N9 处理存在差异。

2.3 氮添加对土壤酶化学计量比的影响

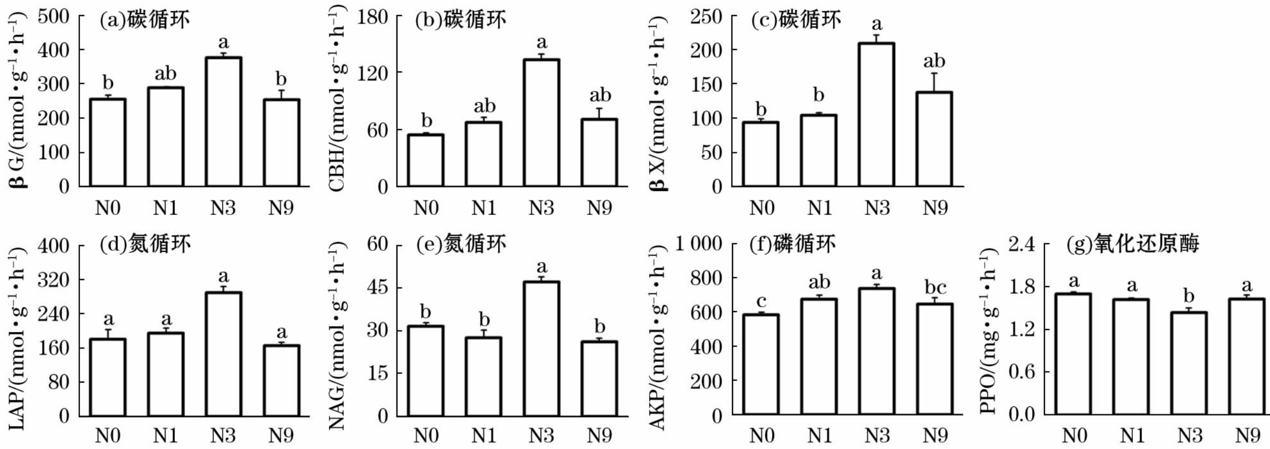
分析 βG，LAP，ANG 和 AKP 活性的化学计量比结果表明（表 2），氮添加对土壤酶活性化学计量比无显著影响。土壤 βG:（LAP + NAG）、βG:AKP 和（LAP + NAG）:AKP 的平均值分别为 1.23、0.44 和 0.36。土壤 ln（βG）:ln（LAP + ANG）均值为 1.03，是潜在 C:N 获取酶活性的指标；土壤 ln（βG）:ln（AKP）均值为 0.87，是潜在 C:P 获取酶活性的指标（表 2）。土壤酶 C:N:P 化学计量比用 ln（βG）:ln（LAP + ANG）:ln（AKP）表示，总体上氮添加下土壤酶化学计量 C:N:P 为 1:1:1.2。土壤酶化学计量 C:N和 N:P 与土壤 TN:TP 均存在负相关（R^2 = 0.33，R^2 = 0.38）（图 3）。

表 1 不同氮添加处理对土壤理化性质的影响

Tab. 1 Effects of different N supply treatment on soil physicochemical properties

土壤理化性质	土壤有机碳 SOC /（g·kg⁻¹）	土壤总氮 TN /（g·kg⁻¹）	土壤总磷 TP /（g·kg⁻¹）	速效氮 AN /（mg·kg⁻¹）	速效磷 AP /（mg·kg⁻¹）
对照 CK	36.38 ±0.25b	4.03 ±0.11a	0.57 ±0.06b	277.33 ±9.72a	9.47 ±0.21a
低氮 N1	39.58 ±0.04a	4.17 ±0.18a	0.53 ±0.01b	256.04 ±11.63a	9.50 ±0.76a
中氮 N3	40.81 ±0.08a	4.18 ±0.06a	0.78 ±0.05a	285.98 ±7.14a	8.36 ±0.58a
高氮 N9	38.15 ±0.71b	3.67 ±0.23a	0.54 ±0.01b	309.83 ±23.70a	8.84 ±0.46a
土壤理化性质	pH	SOC:TN	SOC:TP	TN:TP	
对照 CK	8.12 +0.01a	9.49 ±0.18ab	65.05 ±7.16a	6.90 ±0.61a	
低氮 N1	8.18 +0.03a	9.42 ±0.20ab	74.54 ±1.64a	7.61 ±0.22a	
中氮 N3	8.16 +0.02a	9.92 ±0.06a	51.42 ±1.03b	5.18 ±0.11b	
高氮 N9	8.13 +0.02a	9.02 ±0.2b	70.78 ±1.56a	7.24 ±0.61a	

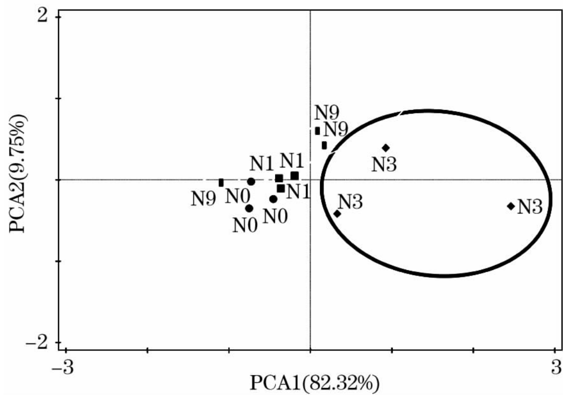
注：同列不同小写字母表示处理间差异显著（P < 0.05）。下同。



注:βG:β－1,4 葡萄糖苷酶(β－1,4－glucosidse),CBH:β－D－纤维二糖水解酶(Cellobiohydrolase),βX:β－1,4 木糖苷酶(β－1,4－xylosidase),LAP:亮氨酸氨基肽酶(L-leucine aminopeptidase),NAG:N－乙酰－β－D 氨基葡萄糖苷(β－1,4－N-acetylgucosaminidase),AKP:碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase),PPO:多酚氧化酶(Phenol oxidase)。

图 1　土壤酶活性对氮添加的响应特点

Fig. 1　Response of soil enzyme activities to N addition



注:对照,N0,0 kg · hm^{-2} · a^{-1};低氮,N1,10 kg · hm^{-2} · a^{-1};中氮,N3,30 kg · hm^{-2} · a^{-1};高氮,N9,90 kg · hm^{-2} · a^{-1}。

图 2　氮添加下土壤酶活性的主成分分析

Fig. 2　Ordination plot of principal component analysis of soil enzyme activities under N addtion

2.4　氮添加下土壤环境因子与酶活性的相关性

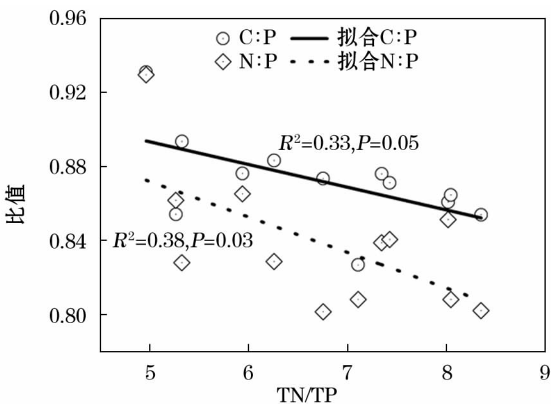
通过 RDA 分析并结合 Pearson 相关系数,分析了土壤酶活性与土壤理化因子间的相互关系。RDA 分析表明:第一、二排序轴特征值分别为 0.821 0、0.085 6,第一、二排序轴累计解释率分别为 81.82% 和 9.60%(图 4),RDA 前两个排序轴保留了土壤酶活性数据总方差的 91.42%,即土壤环境的 9 个因子累计解释土壤酶活性特征的 91.42%,且对土壤酶活性与养分因子关系累计解释量达 99.1%。由此可知,前两轴已能很好反映土壤酶活性与养分因子的关系,且主要是由第一轴决定。对土壤环境的 9 个因子进行概括解释变量影响去选择排序,得到土壤理化性质重要性排序(表 3):9 个环境因子对土壤酶活性的影响的重要性由大到小分别为 SOC、TP、SOC:TP 和 TN:TP,对土壤酶活性的影响呈现显著水平。SOC、TP 对土壤酶活性大小差异的解释分别达到 52.2%、50.4%,这一结果说明,土壤酶活性的差异主要来自碳磷养分含量的影响。同时,SOC:TP、TN:TP 对酶活性差异解释相对较小,但均达到显著水平。Pearson 相关分析表明,氧化还原酶(PPO)活性与 SOC 呈显著负相关(相关系数 r 为 －0.868),碳循环相关酶(βG、CBH、βX)活性与

表 2　氮添加对土壤酶化学计量比特征的影响

Tab. 2　Effects of nitrogen addition on the soil ecoenzymatic stoichiometry

处理	ln(βG):ln(LAP + ANG)	ln(βG):ln(AKP)	ln(LAP + NAG):ln(AKP)	Vector L(length)	Vector A(degree)
N0	1.04 ±0.03a	0.87 ±0.00a	0.84 ±0.02a	1.35 ±0.02a	50.00 ±0.65a
N1	1.05 ±0.01a	0.87 ±0.00a	0.83 ±0.01a	1.36 ±0.01a	50.34 ±0.36a
N3	1.02 ±0.03a	0.89 ±0.02a	0.87 ±0.03a	1.36 ±0.03a	48.91 ±0.96a
N9	1.05 ±0.01a	0.85 ±0.02a	0.81 ±0.01a	1.35 ±0.02a	50.89 ±0.28a
平均值	1.03 ±0.02	0.87 ±0.01	0.84 ±0.18	1.36 ±0.01	50.04 ±0.56

注:同列不同小写字母表示处理间的差异显著(P < 0.05)



注：ln(βG)∶ln(LAP+NAP)表示土壤酶化学计量C∶N，ln(LAP+NAP)∶ln(AKP)表示土壤酶化学计量N∶P；土壤总氮(TN)与土壤总磷(TP)表示TN/TP。

图3　土壤生态酶化学计量比和土壤TN∶TP之间的关系

Fig. 3　Correlations between soil ecoenzymatic stoichiometry and soil TN∶TP

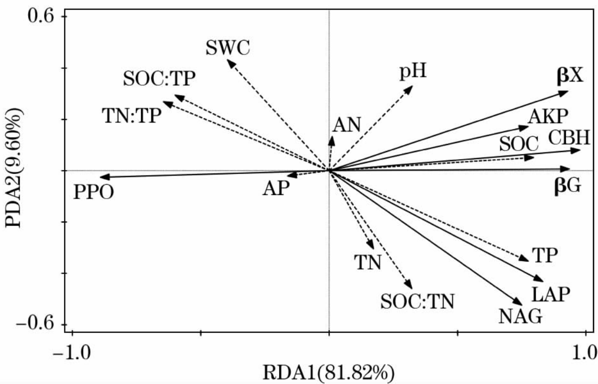


图4　土壤酶活性与土壤环境因子的RDA分析

Fig. 4　Redundancy analysis of relationship between soil environmental factors and extracellular enzyme activities

表3　环境因子解释的重要性排序和显著性检验结果

Tab. 3　Importance ranking and significance level of environmental factors

环境因子	重要项排序	环境因子所占解释量/%	F	P
SOC	1	52.2	10.9	0.002
TP	2	50.4	10.1	0.006
TN∶TP	3	35.1	5.4	0.02
SOC∶TP	4	30.5	4.4	0.028

SOC呈显著正相关(r分别为0.760、0.769、0.712)，氮循环相关酶，其中LAP活性与SOC呈显著正相关(r为0.676)，NAG活性与SOC不存在显著相关关系，磷循环酶(AKP)活性与SOC存在显著正相关(r为0.915)。碳、氮、磷循环相关的酶(βG、CBH、βX、LAP、NAG、AKP)与TP存在显著正相关(r分别为0.708、0.723、0.673、0.806、0.816、0.625)，氧化还原酶(PPO)活性与TP呈显著负相关(r为-0.725)。

3　讨论

3.1　氮添加对土壤酶活性的影响

基于资源配置理论，氮添加促进碳、磷获取酶活性，抑制氮获取酶活性[19]。Jian等[20]关于氮添加对土壤酶活性影响的meta-分析得出，氮添加分别显著增加βG、CBH、βX和AKP活性11.0%、11.2%、12.0%和10.6%。本研究也发现，氮添加促进碳、磷循环相关酶活性。以往研究表明，氮添加会增加凋落物中氮含量、纤维素和半纤维素的浓度，降低木质素和糖类浓度[21]，所以氮添加会促进纤维素降解酶(βG、CBH、βX)活性。氮添加对NAG(N3除外)和LAP酶活性影响不显著，其原因可能是：①巴音布鲁克高寒草原土壤类型是栗钙土，肥力条件较好，土壤SOC∶TN为9.49，低于全球尺度下草地SOC∶TN(13.8)[22]，所以氮添加没有刺激土壤氮获取酶活性。②氮添加通过影响土壤pH影响土壤酶活性。土壤pH可以影响微生物生理、基质与酶的结合以及酶蛋白的形成[22]，氮添加导致土壤酸化，会影响氮获取酶活性[23]，本研究氮添加没有显著改变土壤pH，这可能是本研究氮循环相关酶活性对氮添加不敏感的原因之一。③资源配置理论认为，随着氮添加增加土壤无机氮的浓度，土壤微生物可能会减少氮获取酶的产生[19]，以往的研究大多使用资源分配理论来解释氮获取酶对氮添加的响应，但这似乎是错误的，因为LAP和NAG并没有减少。所以，对于LAP和NAG可能存在另一种氮分配策略。即氮添加增加了土壤氮浓度，但产生这种酶的氮分配保持不变，这可以解释上述发现。当营养限制发生变化时(如，从N限制到P限制)，微生物可能会调整相关酶的生产，以平衡营养需求(微生物需求)和供应(周围环境)之间的营养平衡[24]。氮添加可能使得土壤微生物代谢活动受到磷限制，为了满足土壤微生物磷的需求，需要分泌更多的磷酸酶，把有机磷矿化成无机磷，所以氮添加通过影响微生物活动间接促进磷酸酶活性。酚氧化酶是一种非专一性酶，它分解难降解的高分子化合物，如木质素和腐殖质[21]，其酶活性与土壤细菌数量存在显著正相关，以往研究表明氮添加会降低土壤细菌数量[25]，PPO酶活性也受到抑制。Zak等[26]认为，氮添加会通过抑制表层土壤酚氧化酶活性增加土壤有机碳浓度。

笔者研究结果也表明,氮添加下土壤有机碳浓度增加,且 PPO 活性与 SOC 存在显著负相关($P < 0.05$)。以往也有报道氮添加对 PPO 活性存在促进[2]、抑制[7]和无响应[27]的趋势。微生物分解者使用的氮形态可能因物种而异[28],氮添加对土壤酶活性的影响与生态系统类型、施氮形态和实验时长有关[29],所以本研究和其他研究结果存在差异,可能是因为生态系统类型和施氮形态有关。

3.2 天山高寒草原土壤养分限制因子

土壤碳获取酶、氮获取酶和磷获取酶的活性比(C:N:P)是指示微生物养分需求(尤其是 C、N 和 P)的重要因子,土壤 C、N、P 转化酶活性对数转换后的比值为 1:1:1.2,与全球生态系统 1:1:1 的比值相偏离[10],表明研究区有较高的 P 转化酶活性,反映研究区内相对缺乏 P 元素。Xu 等[12]基于较低的土壤碳获取酶与磷获取酶的活性比和氮获取酶与磷获取酶的活性比[以 βG:AKP 和(LAP + NAG):AKP 酶活性为代表],认为土壤 P 是热带和亚热带森林限制养分循环的元素。本研究的土壤碳获取酶与磷获取酶的活性比和氮获取酶与磷获取酶的活性比低于 Xu 等[12]的报道值,这表明 P 元素是天山高寒草原生态系统养分循环的限制元素。刘红梅等[7]认为,氮添加造成 P 元素成为内蒙古贝加尔针茅草原养分循环的限制因子。苏原等[30]也报道,长期氮添加加剧了天山高寒草原生态系统 P 限制。土壤 βG、LAP、NAG 和 AKP 酶活性化学计量比可作为土壤养分有效性和微生物代谢的指标[31]。本研究土壤碳、氮、磷循环相关酶活性的向量分析表明向量角度大于 45°,核实该研究区受 P 元素限制。原因可能是氮添加促进植物对 P 元素的重吸收[30],致使微生物可利用的磷降低。在模拟区域范围内微生物酶分配、生物量增长和碳矿化的模型中应考虑磷的有效性。

3.3 土壤酶活性变化的驱动因素

长期氮添加背景下,发现非生物因素中土壤 SOC 浓度、TP 浓度是土壤酶活性主要影响因子。土壤养分通过影响土壤酶的生化特性和调节酶的分泌来影响土壤酶的活性[32],土壤氮素可利用性的增加,可以通过提高植物生物量、微生物对养分的获取等来增加土壤碳(C)的输入[33],土壤碳的输入会影响受碳限制的腐生微生物,因此氮素可利用性通过改变土壤有机碳的浓度来影响土壤酶活性。土壤碳和氮是土壤胞外酶活性变化的主要因素[34],本研究得出土壤 βG、CBH、βX、LAP 和 AKP 活性与 SOC 存在显著正相关,PPO 活性与 SOC 存在显著负相关($P < 0.05$)。磷酸酶催化有机磷水解为有效磷,因此,磷酸酶活性与土壤有效磷之间存在显著正相关[35],然而 Gong 等[36]发现土壤磷酸酶活性与土壤有效磷不相关,与土壤总磷存在显著正相关。笔者的研究也表明,土壤磷酸酶活性与土壤总磷存在显著正相关,说明天山高寒草原磷酸酶活性受基质利用率的高度调控。

4 结 论

本研究依托中国科学院巴音布鲁克草原生态系统研究站,开展连续 10 a 氮添加对土壤酶活性的影响研究,分析土壤酶化学计量比以及土壤酶活性与土壤环境因子的关系,得出以下结论:

(1)土壤酶活性变化的关键因子是 SOC 和 TP。氮添加背景下,碳、氮、磷循环相关的酶(βG、CBH、βX、LAP、NAG、AKP)活性与土壤 SOC 浓度(NAG 除外)和 TP 浓度呈显著正相关,PPO 酶活性与土壤 SOC 浓度和 TP 浓度呈显著负相关。

(2)土壤 C、N、P 酶活性的变化会影响土壤 C、N、P 循环。氮添加背景下,βG、CBH、βX 酶活性的增加和 PPO 酶活性的降低刺激土壤有机碳浓度增加,LAP 和 NAG 酶活性无显著变化,土壤有效氮和总氮浓度变化也不显著,AKP 酶活性的增加伴随着土壤总磷的增加(N3 水平)。

参考文献(References):

[1] Liu X J, Duan L, Mo J M, et al. Nitrogen deposition and its ecological impact in China: an overview[J]. Environmental Pollution, 2011, 159(10): 2251 - 2264.

[2] 王杰, 李刚, 修伟明, 等. 氮素和水分对贝加尔针茅草原土壤酶活性和微生物碳氮的影响[J]. 农业资源与环境学报, 2014, 31(3): 237 - 245. [Wang Jie, Li Gang, Xiu Weiming, et al. Effects of nitrogen and water on soil enzyme activity and soil microbial biomass in *Stipa baicalensis* steppe, Inner Mongolia of North China[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2014, 31(3): 237 - 245.]

[3] Li J W, Jian S Y, Koff J D, et al. Differential effects of warming and nitrogen fertilization on soil respiration and microbial dynamics in switchgrass croplands[J]. Global Change Biology Bioenergy, 2018, 10(8): 565 - 576.

[4] Zhou X B, Zhang Y M, Alison D. Non-linear response of microbial activity across a gradient of Nitrogen addition to a soil from the Gurbantunggut Desert, northwestern China[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 47: 67 - 77.

[5] 苏洁琼,李新荣,鲍婧婷. 施氮对荒漠化草原土壤理化性质及酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2014,25(3):664 - 670. [Su Jieqiong,Li Xinrong,Bao Jingting. Effects of nitrogen addition on soil physico-chemical properties and enzyme activities in desertified steppe[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2014,25(3):664 - 670.]

[6] 闫钟清,齐玉春,彭琴,等. 降水和氮添加增加对草地土壤酶活性的影响[J]. 生态学报,2017,37(9):3019 - 3027. [Yan Zhongqing,Qi Yuchun,Peng Qin,et al. Effects of increased precipitation and nitrogen deposition on soil enzyme actives[J]. Acta Ecologica Sinica,2017,37(9):3019 - 3027.]

[7] 刘红梅,周广帆,李洁,等. 氮添加对贝加尔针茅草原土壤酶活性的影响[J]. 生态环境学报,2018,27(8):1387 - 1394. [Liu Hongmei,Zhou Guangfan,Li Jie,et al. Effects of nitrogen deposition on soil enzyme activities of *Stipa baicalensis* steppe[J]. Ecology and Environmental Sciences,2018,27(8):1387 - 1394.]

[8] 乔航,莫小勤,罗艳华,等. 不同林龄油茶人工林土壤酶化学计量及其影响因素[J]. 生态学报,2019,39(6):1887 - 1896. [Qiao Hang,Mo Xiaoqin,Luo Yanhua,et al. Patterns of soil eco-enzymatic stoichiometry and its influencing factors during stand development in *Camellia oleifera* palntations[J]. Acta Ecologica Sinica,2019,39(6):1887 - 1896.]

[9] Schimel J P,Weintraub M N. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil:a theoretical model[J]. Soil Biology and Biochemistry,2003,35(4):549 - 563.

[10] Sinsabaugh R L,Lauber C L,Weintraub M N,et al. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale[J]. Ecology Letters,2008,11(11):1252 - 1264.

[11] Hill B H,Elonen C M,Seifert L R,et al. Microbial enzyme stoichiometry and nutrient limitation in US streams and rivers[J]. Ecological Indicators,2012,18:540 - 551.

[12] Xu Z W,Yu G R,Zhang X Y,et al. Soil enzyme activity and stoichiometry in forest ecosystems along the North-South Transect in eastern China (NSTEC)[J]. Soil Biology and Biochemistry,2017,104:152 - 163.

[13] 张颖,刘学军,张福锁,等. 华北平原大气氮素沉降的时空变异[J]. 生态学报,2006,26(6):1633 - 1639. [Zhang Ying,Liu Xuejun,Zhang Fusuo,et al. Spatial and temporal variation of atmospheric nitrogen deposition in North China Plain[J]. Acta Ecologica Sinica,2006,26(6):1633 - 1639.]

[14] 周婕成,史贵涛,陈振楼,等. 上海大气氮湿沉降的污染特征[J]. 环境污染与防治,2009,31(11):30 - 34. [Zhou Jiecheng,Shi Guitao,Chen Zhenglou,et al. Contamination characteristics of nitrogen in rainwater of Shanghai[J]. Environmental Pollution and Control,2009,31(11):30 - 34.]

[15] 鲁如坤. 土壤与农业化学分析[M]. 北京:中国农业科技出版社,2000. [Lu Rukun. Soil and Agro-chemistry Analysis[M]. Beijing:China Agricultural Science and Technology Press,2000.]

[16] Marxa M C,Wooda M,Jarvis S C. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils[J]. Soil Biology and Biochemistry,2001,33(12 - 13):1633 - 1640.

[17] 关松荫. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1986. [Guan Songyin. Soil Enzyme and its Study Methods[M]. Beijing:China Agriculture Press,1986.]

[18] Moorhead D L,Rinkes Z L,Sinsabaugh R L,et al. Dynamic relationships between microbial biomass,respiration,inorganic nutrients and enzyme activities:informing enzyme-based decomposition models[J]. Frontiers in Microbiology,2013,4:223.

[19] Allison S D,Vitousek P M. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs[J]. Soil Biology and Biochemistry,2005,37(5):937 - 944.

[20] Jian S Y,Li J W,Chen J,et al. Soil extracellular enzyme activities,soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization:A meta-analysis[J]. Soil Biology and Biochemistry,2016,101:32 - 43.

[21] Allison S D,Lu Y,Weihe C,et al. Microbial abundance and composition influence litter decomposition response to environmental change[J]. Ecology,2013,94(3):714 - 725.

[22] Sinsabaugh R L. Phenol oxidase,peroxidase and organic matter dynamics of soil[J]. Soil Biology and Biochemistry,2010,42(3):391 - 404.

[23] Zhang X Y,Tang Y Q,Shi Y,et al. Responses of soil hydrolytic enzymes,ammonia-oxidizing bacteria and archaea to nitrogen applications in a temperate grassland in Inner Mongolia[J]. Scientific Reports,2016,6:32791.

[24] Mineau M M,Fatemi F R,Fernandez I J,et al. Microbial enzyme activity at the watershed scale:response to chronic nitrogen deposition and acute phosphorus enrichment[J]. Biogeochemistry,2014,117(1):131 - 142.

[25] Luo L,Meng H,Wu R N,et al. Impact of nitrogen pollution/deposition on extracellular enzyme activity,microbial abundance and carbon storage in coastal mangrove sediment[J]. Chemosphere,2017,177:275 - 283.

[26] Zak D R,Holmes W E,Burton A J,et al. Simulated atmospheric NO_3^- deposition increases soil organic matter by slowing decomposition[J]. Ecological Applications,2008,18(8):2016 - 2027.

[27] Yang S,Xu A W,Wang R Z,et al. Variations in soil microbial community composition and enzymatic activities in response to increased N deposition and precipitation in Inner Mongolian grassland[J]. Applied Soil Ecology,2017,119:275 - 285.

[28] 彭春菊,李全,顾鸿昊,等. 模拟氮添加及经营方式对毛竹林土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2017,28(2):423 - 429. [Peng Chunju,Li Quan,Gu Honghao,et al. Effects of simulated nitrogen deposition and management type on soil enzyme activities in Moso bamboo forest[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2017,28(2):423 - 429.]

[29] Wang C Y,Lyu Y N,Liu X Y,et al. Ecological effects of atmospheric nitrogen deposition on soil enzyme Activity[J]. Journal of Forestry Research,2013,24(1):109 - 114.

[30] 苏原,罗艳,耿凤展,等. 天山高寒草原植物叶片氮磷化学计量特征对氮添加的响应[J]. 干旱区研究,2019,36(2):430 - 436. [Su Yuan,Luo Yan,Geng Fengzhan,et al. Response of stoi-

chiometric characteristics of nitrogen and phosphorus in leaf to nitrogen deposition in an alpine grassland of Tianshan mountains [J]. Arid Zone Research,2019,36(2):430 – 436.]

[31] Sinsabaugh R L,Hill B H,Follstad Shah J J. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment[J]. Nature,2009,462(7274):795 – 798.

[32] Cleveland C C,Liptzin D. C:N:P stoichiometry in soil:is there a "Redfield ratio" for the microbial biomass? [J] Biogeochemistry, 2007,85:235 – 252.

[33] 李嵘,常瑞英. 土壤有机碳对外源氮添加的响应及其机制[J]. 植物生态学报,2015,39(10):1012 – 1020. [Li Rong, Chang Ruiying. Effects of external nitrogen additions on soil organic carbon dynamics and the mechanism[J]. Chinese Journal of Plant Ecology,2015,39(10):1012 – 1020.]

[34] Banerjee S,Bora S,Thrall P T,et al. Soil C and N as causal factors of spatial variation in extracellular enzyme activity across grassland-woodland ecotones[J]. Applied Soil Ecology,2016,105:1 – 8.

[35] Hopkins D W,Sparrow A D,Shillam L L,et al. Enzymatic activities and microbial communities in an Antarctic dry valley soil:responses to C and N supplementation[J]. Soil Biology and Biochemistry,2008,40(9):2130 – 2136.

[36] Gong S W,Zhang T,Guo R,et al. Response of soil enzyme activity to warming and nitrogen addition in a meadow steppe[J]. Soil Research,2015,53(3):242 – 252.

Effects of nitrogen addition on soil enzyme activities and ecoenzymatic stoichiometry in alpine grassland of the Tianshan Mountains

LE Jia-jia[1,2], SU Yuan[1,2], PENG Qing-wen[1,2], GENG Feng-zhan[1,2], HAN Wen-xuan[1,3], LI Wen-li[4], LI Kai-hui[1,5], LIU Xue-jun[1,3]

(1. *Key Laboratory of Biogeography and Bioresource in Arid Land, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi* 830011, *Xinjiang, China*;
2. *University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*;
3. *College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing* 100193, *China*
4. *Grassland Station of Bayingol mongolian autonomous prefecture of Xinjiang, Korla* 841000, *Xinjiang, China*;
5. *Bayinbuluk Grassland Ecosystem Research Station, Chinese Academy of Sciences, Bayinbuluk* 841314, *Xinjiang, China*)

Abstract: The effects of nitrogen (N) addition on activities of soil carbon (C), N, and phosphorus (P) circulation-related enzymes were investigated in an alpine grassland ecosystem in 2018. A long-term simulated N addition experiment was initiated at the Bayinbuluk Grassland Ecological Research Station of the Chinese Academy of Sciences in 2009; four N fertilizer treatments were applied at different sites: control (N0, 0 kg · hm^{-2} · a^{-1}), low nitrogen (N1, 10 kg · hm^{-2} · a^{-1}), moderate nitrogen (N3, 30 kg · hm^{-2} · a^{-1}), and high nitrogen (N9, 90 kg · hm^{-2} · a^{-1}). In the present study, stoichiometric ratios of soil ecological enzymes and the relationships between soil enzyme activities and environmental factors were analyzed. Our results revealed the following. Compared with N0, N3 treatment significantly increased β – 1,4 – glucosidase (BG), cellobiohydrolase (CBH) and β – 1,4 – xylosidase activities (βx) ($P < 0.05$). N1 and N3 treatments obviously increased phenol oxidase (PPO) activity ($P < 0.05$). N3 treatment obviously increased β – 1,4 – N-acetylglucosaminidase (NAG) activity ($P < 0.05$). No N treatment affected L-leucine aminopeptidase activity (LAP). Correlation analysis showed that activities of all soil enzymes were positively correlated to soil organic C (SOC) content (except NAG) and total phosphorus (TP) content but were not to total nitrogen content. Soil ecoenzymatic C∶N∶P stoichiometry in the study area was 1∶1∶1.2, which is inconsistent with the global 1∶1∶1 pattern. This result suggests that soil microbial growth in the studied grasslands is limited by P content. Canonical redundancy analysis indicated that SOC and TP were the dominant factors affecting soil enzyme activity.

Key words: nitrogen addition; soil enzyme activity; soil ecoenzymatic stoichiometry; nutrient limitation; alpine grassland; Bayinbuluk